

TARTU ÜLIKOOL
EESTI MEREINSTITUUT JA ÖKOLOOGIA JA MAATEADUSTE INSTITUUT
ZOOLOOGIA OSAKOND
LOODUSRESSURSSIDE ÕPPETOOL

Kristo Ets

**OOTSÜÜDI KÜPSEMINE JA OVULATSIOON KALADEL.
AHVENA *PERCA FLUVIATILIS* (L.) OVULATSIOON NING
MARJALINDI MOODUSTUMINE.**

Bakalaureusetöö

Juhendaja: Toomas Saat

Tartu 2015

Sisukord

Sissejuhatus	4
1 Kirjanduse ülevaade	6
1.1 Muutused ootsüüdis küpsemisprotsessi käigus.....	6
1.1.1 Protsessilised muutused.....	7
1.1.2 Muutused tsütoplasmas	8
1.1.3 Muutused ootsüüdi tuumas	9
1.1.4 Ootsüütide küpsemise hormonaalne regulatsioon	10
1.2 Ovulatsioon ja ootsüüdis toimuvad muutused	13
1.2.1 Ovulatsiooni protsess.....	13
1.3 Ootsüütide küpsemise ja ovulatsiooni esilekutsumine kaladel.....	14
1.3.1 Indutseerimine <i>in vivo</i> tingimustes	14
1.3.2 Indutseerimine <i>in vitro</i> tingimustes	16
2 Praktiline osa	17
2.1 Materjal ja meetodika	17
2.2 Tulemused.....	19
2.3 Arutelu	26
Kokkuvõte	28
Summary.....	30
Tänu sõnad.....	32
Kasutatud kirjandus	33
Lisa 1.	38

Sissejuhatus

Ahvenat *Perca fluviatilis* L. loetakse Euroopas majanduslikult kümne tähtsama magevee kalaliigi hulka ning samuti ka perspektiivikaks liigiks suurendamiseks vesiviljeluse mitmekesisust (Fontaine *et al.*, 2008). Euroopas on loodud ka ahvena kasvandusi: näiteks Perchitech (Šveitsis) ja Lucas Perches (Prantsusmaal, alates 2001), ent siiski jääb veel tehistingimustes kasvatatud ahvena müügi osakaal võrreldes looduslikest veekogudest püütud kogusega väikseks. Üheks olulisemaks probleemiks peetakse tootluse hooajalisust ja tootmismahu ebastabiilsust. Samuti on vaja ahvena tööstusharu jätkusuutlikkuseks tagada stabiilne elujõuline ja majanduslikult väärtuslik järelkasv. Viimasel ajal on tehtud mitmeid uuringuid parandamiseks tehistingimustes kasvatavate ahvenate tootlikkust ja järglaspõlvkondade kvaliteeti. Uuritud on valgustingimuste mõju sigimisperioodi algusele (Migaud *et al.*, 2004a), biootiliste ja abiootiliste faktorite mõju ahvena kasvule (Mélard *et al.*, 1996) ning ka erinevate keskkonnatingimuste koosmõju ahvena sigimiskäitumisele väljaspool kudemishooaega (Migaud *et al.*, 2004b).

Teadmised kalade ootsüütide küpsemise ja ovulatsiooni toimumismehhanismide kohta omavad tähtsust kalakasvatustes, tagamaks viljastamisvõimeliste munarakkude saamise kalade taastootmiseks. Praegusel ajal on kalade ootsüütide küpsemise ja ovulatsiooni üldised mehhanismid selged. Tuntakse ootsüüdis toimuvaid morfoloogilisi muutusi ning neid juhtivaid hormonaalseid mõjusid. Vähem on teadmisi molekulaarsel ja genoomsel tasandil, kus spetsiifilised küpsemis- ja ovulatsiooniprotsesse juhtivad mehhanismid on seni teadmata.

Ootsüüdi küpsemiseks laias tähenduses peetakse kogu ootsüüdi kasvamise ja arenemise perioodi, mis eelneb ovulatsioonile (Patiño *et al.*, 2001). Käesolevas töös käsitletakse küpsemist kitsamas tähenduses kui perioodi, mil kasvu lõpetanud meioosi profaasis arestitud tuumaga ootsüüdis toimuvad hormoonide mõjul muutused tuumas (I profaasi lõppemisest meioosi teise jagunemise metafaasini) ja tsütoplasmas. Tulemusena moodustub viljastamisküps munarakk. Küpsemisele järgneb vahetult ovulatsioon, mille käigus vabaneb küps ootsüüt (mida sel hetkel nimetatakse juba munaks) munasarja folliikulist.

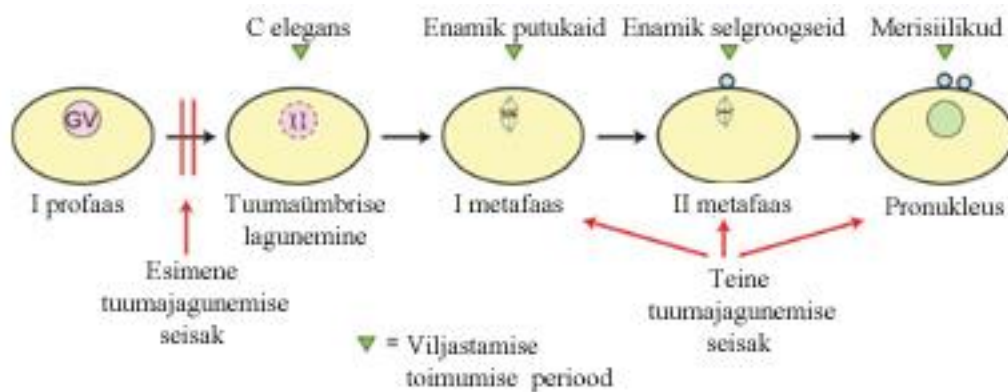
Kalade ootsüüdid ovuleeruvad individuaalselt. Kuna paljudel bentiliste munarakkudega kaladel munaraku radiaalkest on kleepuv, siis võivad munarakud moodustada kogumeid. Kuna ahvena ovuleerunud munarakud moodustavad ühtse toruja lindi, mille seintes asuvad munad ühekihilise moodustisena, siis on varem arvatud (Кошелев, 1984), et ahvenatel toimub ovulatsioon erinevalt teistest kalaliikidest: ootsüüte kattev follikulaarepiteel lõhestub lamelli keskjoone tasemel ja eemaldub lintjast moodustisest nagu „katus“ (Lisa 1). Siiani on ahvenal küll uuritud ootsüüdi morfoloogilisi ja keemilisi muutuseid *in vivo* katsetes, (Żarski *et al.*, 2012a), erinevate hormoonide (Rónyai & Lengyel, 2010; Targónska *et al.*, 2014) ning keskkonnategurite (Migaud *et al.*, 2004b) mõju küpsemisstaadiumi indutseerimiseks kunstlikes tingimustes, kuid spetsiaalsed uuringud ahvenale omase marjalindi moodustumisest puuduvad.

Käesoleva töö eesmärkideks on 1) anda kirjanduse põhjal ülevaade kalade ootsüütide küpsemisprotsessis toimuvatest muutustest ja hormonaalsest regulatsioonist, 2) selgitada katseliselt, kas ahvena ootsüütide ovulatsioon toimub Košelevi (1984) kirjelduste kohaselt, mis erineb teiste liikide omast, või tavapäraselt, kus ootsüüdid ovuleeruvad ühekaupa ning marjalint moodustub hiljem.

1 Kirjanduse ülevaade

1.1 Muutused ootsüüdis küpsemisprotsessi käigus

Munarakkude areng loomades on jaotatud üldiselt kolme etappi: munarakkude eellasrakkude (ootsüütide) kasvuperiood, küpsemisperiood ja ovulatsioon. Kasvuperioodil toimub ootsüütidesse vajalike valkude ja toitainete kogumine, küpsemisperioodil valmistatakse rakk ette viljastumiseks ja ovulatsiooni käigus vabaneb küps muna munasarja. Antud töös on ootsüütide areng jaotatud tuuma arenguastmete alusel (joonis 1). Vastavalt tuuma arenguetaappidele kestab kasvuperiood kuni tuuma esimese meiootilise arengu peatamiseni (esineb enamasti meioosi I profaasis). Küpsemisperioodi alguseks loetakse arengulist etappi, mil hormoonide mõjul jätkatakse tuumajagunemist ning kestab kuni teise meiootilise jagunemise seisakuni, mis on eri liikidel eri aegadel. Pärast ovulatsiooni, viljastumishetkel, viiakse tuuma meiootiline areng lõpuni.



Joonis 1. Ootsüütide meiootiline areng eri liiki isenditel. Enamikul liikidest toimub esimene tuuma meiootilise jagunemise seisak I profaasis. Hormoonide mõjul jätkatakse tuuma arengut ning teine seisak toimub *C. elegans*’il juba pärast tuumaümbrise jagunemist (I profaasis), putukatel I metafaasis, selgroogsetel (sh. kaladel) II metafaasis ja merisiilikutel viiakse tsükkel lõpuni. Kõigil liikidel jätkatakse tuuma meiootilist arengut pärast viljastamist, merisiilikutel käivitab munaraku viljastamine juba munaraku meiootilise arengu (Kim *et al.*, 2013 järgi).

1.1.1 Protsessilised muutused

Oogeneesi lõppstaadiumitel, küpsemisperioodil, toimuvad ootsüüdi tuumas meiosisijagunemised ja tsütoplasma omaduste muutused. Protsessi tulemusena saab ootsüüt munarakuks, mis on võimeline viljastuma ning ka edasi arenema (Patiño & Sullivan, 2002). Küpsemisperioodiks nimetatakse ajajärku ootsüüdi arengus, mis algab staadiumist, kus follikulaarepiteeliga kaetud kasvu lõpetanud meioosi profaasis olev ootsüüt omandab võime sobivates keskkonnatingimustes reageerida stimuleeritavatele hormoonidele (kaladel ja ka teistel selgroogsetel hüpofüüsi gonadotroopsetele hormoonidele), mis viib tuuma meiootilise arengu jätkamiseni. Toimuvad muutused tsütoplasmas. ning ootsüüti ümbritsevas follikulaarepiteelis. Küpsemine lõpeb staadiumiga, kus ootsüüt on valmis ovuleeruma ning seemnerakkudega kokkupuutel viljastuma. Sel hetkel nimetatakse ootsüüti juba munarakuks (Goetz & Garczunski, 1997).

Ootsüüdi küpsemise käigus jätkatakse ootsüüdi meiootilist jagunemist. Kasvuperioodil, mil ootsüüti kogunevad vajalikud valgud ja mRNA-d ning ladestuvad rebugraanulid ning lipiidtilgad, on tuuma areng peatatud esimese meiootilise jagunemise profaasis. Küpsemise algul hakkab ootsüüdi keskel paiknev tuum liikuma rohkem perifeersemasse asendisse (animaalse pooluse poole). Seejärel tuumaümbris lahustub ja lõpeb meioosi esimene jagunemine ning algab teine jagunemine. Meioos seiskub taas II metafaasis, mil küpsemisprotsess on lõppenud. Munaraku tuum on meioosi teise jagunemise metafaasis kuni muna aktiveerumiseni viljastumisel. (Patiño & Sullivan, 2002). Küpsemise ja meioosi jätkumine ning sellele järgnev munaraku ovulatsioon on hormoon-sõltuvad protsessid (vt ka 1.1.4).

1.1.2 Muutused tsütoplasmas

Meiootilise jagunemise jätkumise käigus toimuvad mitmed muutused tsütoplasmas. Tegemist on protsessiga, mida nimetatakse tsütoplasmaatiliseks küpsemiseks. Tsütoplasmaatilise küpsemise käigus toimuvad muutused on hiljem vajalikud muna viljastumise õnnestumiseks ning ka embrüo normaalseks arenguks (Patiño & Sullivan, 2002).

Ootsüüdis liiguvad kortikaalgraanulid ootsüüdi pinna lähedale ning paigutuvad ühekihiliselt. Graanulid seostuvad mikrofilamentidele ning seejärel toimub nende transport (Wessel *et al.*, 2002). Kortikaalgraanulite translokatsioon on oluline viljastumisel. Spermi sisenemisel munaraku aktiveerimisel vabastavad nad oma sisu munaraku ekstratsellulaarsesse maatriksisse ning moodustavad kesta, et vältida polüspermiat.

Tsütoplasmaatilise küpsemise käigus toimub ootsüüti kasvamise käigus ladestunud valgu – vitellogeniini (Vg) – sekundaarne lõhustamine väiksemateks osadeks. Esmane lagundamine toimub kasvamisperioodil ladestumise käigus, mil valke transporditakse ootsüüti veresoonte vahendusel. Vitellogeniinide lagundamine toimub hüdroolüüsiga. See on spetsiifiline protsess, kus kindlate toimub Vg vormide selektiivne lagundamine (Sullivan *et al.*, 2003).

Vitellogeniinide sekundaarse hüdroolüüsi tulemusel tekivad vabad aminohapped, mille tõttu muutub ootsüüdis osmootne tasakaal ning vesi hakkab sisenema – ootsüüt hüdrateerub. Ootsüüt paisub ning muutub läbipaistvamaks. Lisaks vabadele aminohapetele, osalevad hüdrateerumise protsessis ka mitmed ioonid, nagu näiteks K^+ , Cl^- , P_i Na^+ (Børge & Finn, 2008; Skoblina, 2010). Kui Na^+ -kontsentratsioon kasvab kogu küpsemisperioodi vältel, siis K^+ -kontsentratsioon ainult tuumaümbrise lagunemiseni, ent K^+ sisenemiskiirus on kaks korda suurem (Skoblina, 2010). Hüdrateerumine langeb ajaliselt kokku tuumaümbrise lagunemisega. Lisaks on samal ajal küpsemist soodustava hormooni tase veres jõudnud maksimaalse kontsentratsiooni juurde (Sullivan *et al.*, 2003).

Vee sisenemine võib toimuda mitmel viisil. Ioonide ja vabade aminohapete kontsentratsiooni kasvades muutub ootsüüdi ja väliskeskkonna vahel osmootne tasakaal. Selle tulemusel hakkab vesi sisenema läbi lipiidse membraani lihtsa difusiooni teel. Lisaks difusioonile esinevad ootsüütide membraanides spetsiaalsed kanalivalgud e akvaporinid. Akvaporinid on membraani läbivad valgud, mille kaudu liigub vesi mööda osmootset gradienti ootsüüti efektiivsemalt kui difusiooni teel. Akvaporinid esinevad eriti arvukalt just merekaladel (pelaagiliste munarakkudega) ja katadroomsetel kaladel. (Lubzens *et al.*, 2010).

Hüdrateerumise tulemusel suureneb ootsüüdis turgorrõhk ning ootsüüdi maht võib suurenedagi mitmekordseks. Enim kasvab ootsüüt pelaagilistel (vees uppumatute munadega) kalade puhul, kus hüdrateerumine suurendab küpse muna ujuvust (Coward *et al.*, 2002). Koos vee sisenemisega muutub ka tsütoplasma selgenemine ja läbipaistvamaks muutumine. Ootsüüdi ja folliikuli vahelised ühendused nõrgenevad ning moodustub perivitelliinruumi alge. Lisaks toimub hüdrateerumise ajal lipiidiosakeste ühinemine, moodustades nähtava lipiiditilga (Sullivan *et al.*, 2003).

1.1.3 Muutused ootsüüdi tuumas

Ootsüüdi küpsemise käigus toimuvad tuumas selged muutused: tuumaümbrise lagunemine, kromosoomide kondenseerumine, esimese polaarkeha vabanemine. Lisaks tuum, mis algselt asetseb ootsüüdi tsentris, liigub hormonaalsete mõjutuste tagajärjel animaalse pooluse poole. Vastavalt tuuma ja tsütoplasma muutustele on ootsüüdi küpsemine jaotatud seitsmesse etappi alates rebu moodustumisest kasvufaasis kuni ovulatsioonini (Żarski *et al.*, 2012b järgi):

- I staadium – ootsüüdi tuum e. idupõieke (IP) asetseb tsentraalselt, õlilitgakesed tsütoplasmas (liikidel, kellel need esinevad) ja rebugraanulid on väikesed või pole eristatavad,
- II staadium – IP migratsiooni algus, õlilitgakeste ja rebugraanulite ühinemise algus,

- III staadium – migreeruv IP on läbinud oma teekonnast poole, jätkub õlitilkade ja rebugraanulite liitumine,
- IV staadium – IP on liikunud üle poole oma teekonnast, suur õlitilk on selgesti eristatav ning on suurem kui IP,
- V staadium – moodustunud on ootsüüdist läbimõõdult umbes poole väiksem õlitilk,
- VI staadium – tuumaümbris on lagunenu – idupõie ei ole eristatav, ootsüüdid on muutunud läbipaistvateks,
- VII staadium - ovulatsioon.

1.1.4 Ootsüütide küpsemise hormonaalne regulatsioon

Ootsüütide areng on juhitud hüpotaalamus-hüpofüüs-folliikulaarepiteel telje kaudu. Hüpotaalamus, mis võtab vastu välismõjude signaale, mõjutab hormonaalselt hüpofüüsi ning käivitab sisemiste muutuste raja, mille tulemusena käivitatakse munasarjas ootsüütide küpsemisstaadium.

Kogu protsessi põhiline regulaator on gonadotropiini-vabastav hormoon (GTH-VH). GTH-VH tootmine toimub hüpotaalamuses ning sünteesi mõjutavad mitmed välised tingimused: vee temperatuur, valguse osakaal ööpäevas, vee taseme hooajaline kõikumine, sademed, toidu hulk (Rottmann *et al.*, 1991). Erinevate optimaalsete keskkonnatingimuste koosmõjud kutsuvad kalades esile närviimpulsid ajus, mis stimuleerivad hüpotaalamus-hüpofüüs-folliikulaarepiteelteljel toimuvaid endogeenseid protsesse (Coward *et al.*, 2002). See toob endaga kaasa suurenenud koguses gonadotropiinide vabastamise verre ajuripatsi poolt. Igal liigil on omad spetsiifilised tingimuste väärtused, mis viivad ootsüütid küpsemisstaadiumisse.

GTH-VH poolt kontrollitav ootsüütide areng on lisaks keskkonnatingimustele kontrollitud ka dopamiini poolt (Dufour *et al.*, 2010). Dopamiin pärssib nii GTH-VH hormooni vabastamist kui ka takistab antud hormooni seostumist GTH-VH retseptoritega, mille tõttu ei saa toimuda ka sugurakkude küpsemist.

Hüpotaalamuse poolt toodetud gonadotropiini-vabastava hormooni mõjul hakatakse hüpofüüsis tootma gonadotropiine (GTH) (Ankley & Rodney, 2004). Gonadotropiinid transporditakse veresoonte vahendusel gonaadi, kus nad reageerivad folliikuli teekakihi rakkudel esinevate pinnaretseptoritega. Gonadotropiinide mõjul toimuvad gonaadis muutused, mis viivad ootsüüdi küpsemisstaadiumi alustamiseni (Nagahama, 1994).

Gonadotropiine on kalades kui ka teistes selgroogsetes kahte tüüpi: GTH-I ja GTH-II. Kumbki on seotud munarakkude arengus eri etappidel (Nagahama, 1994). GTH-I tüüpi gonadotropiinide kontsentratsioon veres tõuseb järsult ootsüüdi kasvuperioodi alguses ning langeb vahetult enne küpsemisstaadiumi algust. Samas GTH-II tüüpi gonadotropiinide tase veres tõuseb vahetult enne küpsemist, mis viitab tema olulisusele küpsemisprotsessi käivitamises.

Kaladel on teada põhiliselt kaks gonadotropiini: folliikuleid stimuleeriv hormoon (FSH) ja luteniseetiv hormoon (LH). Küpsemiseelseid protsesse (oogeneesi alustamist ja kasvuperioodi) kontrollib põhiliselt folliikuleid stimuleeriv hormoon. Teise gonadotropiini, luteniseeriva hormooni, ülesandeks kalades on küpsemisperioodi ning ovulatsiooni algatamine (Rosenfeld *et al.*, 2007).

Ootsüüdi kasvuperioodi lõpus kasvab veres LH tase märgatavalt (Lubzens *et al.*, 2010). LH mõjub otse folliikuli teeka rakkude kihile, seostudes pinnaretseptoritele. Käivituvad protsessid, mis viivad ootsüüdi tsütoplasma küpsuskompetentsuse saavutamiseni (Patiño & Sullivan, 2002).

Küpsemiskompetentsuseks nimetatakse olukorda, mil ootsüüt on võimeline jätkama meioosi küpsemist soodustava hormooni (KIH) mõjul. (Patiño & Sullivan, 2002). Tegemist on kahe-etapilise protsessiga. Esmalt saavutab folliikul võime toota küpsemist soodustavat hormooni ja seejärel, teises etapis, saavad ootsüüdid võime sellele reageerida (Patiño *et al.*, 2001).

Esimene etapp on gonadotropiinist - luteniseerivast hormoonist - sõltuv protsess (Goetz & Garczunski, 1997). LH tase on kogu ootsüüdi kasvamise käigus madal, kuid kontsentratsioon veres tõuseb märgatavalt vahetult enne küpsemise algust (Goetz & Garczunski, 1997; Ge, 2005), mis viitab selle olulisusele küpsemisprotsessis. Kui LH on seondunud folliikuli teeka rakkude kihi retseptoritele, toimub küpsemist soodustava hormooni tootmine (KIH) (Nagahama, 1994).

Kui folliikuli rakud hakkavad tootma küpsemist soodustavat hormooni, toimub KIH-sõltuv meioosi jätkamine. Katsetega on näidatud, et antud steroidhormoon mõjub ootsüüdi plasmamembraani pinnaretseptoritele. KIH sisestamisel kasvu lõpetanud ootsüüti ei toimunud mingeid muutusi arengus, kuid hormooniga väliselt mõjutades, alustas ootsüüt küpsemisfaasi (Nagahama, 1994).

Erinevatel sugukondadel on leitud küpsemist soodustava hormoonina erinevad progesterooni vormid. Kaladel esinevad vastavalt $17\alpha,20\beta$ -dihüdroksü-progesteron ($17,20\beta$ P) (lõhilastel) (Nagahama, 1987) või $17,20\beta,21$ -trihüdroksü-progesteron (20β -S) (ahvenlastel) (Skoblina, 2009).

Lisaks KIH-le on täheldatud, et meioosi jätkamises osaleb ka insuliinisarnane kasvufaktor (IGF) (Maestro *et al.*, 1999). Tegemist on KIH-st sõltumatu protsessiga, kus arvatakse osalevat IGF-retseptor (Sullivan *et al.*, 2003). IGF viis ootsüütide meioosi jätkamiseni ka ilma progesterooni ega KIH-d kasutamata.

1.2 Ovulatsioon ja ootsüüdis toimuvad muutused

1.2.1 Ovulatsiooni protsess

Folliikuli-sisesele meiootilisele küpsemisele järgneb vahetult ovulatsioon, mis on ka emassugurakkude arengu viimaseks arenguetapiks enne viljastumist. Pärast meioosi taasalustamist, mil ootsüüt on jõudnud II küpsemisjagunemise metafaasi staadiumini, toimub ovulatsiooni käigus küpse ootsüüdi vabanemine folliikulist munasarja (mõnedel kaladel otse kõhuõõnde) (Lubzens *et al.*, 2010). Ovulatsioonieelsel perioodil toimuvad mitmed ettevalmistavad alaetapid, nagu folliikuli-ootsüüdi omavaheliste ühenduste katkemine, folliikuli kesta katkimine ning ootsüüdi väljapaistamine folliikulist (Patiño & Sullivan, 2002).

Ootsüüdi vabanemine toimub läbi folliikulis tekkiva avause, mis hõlmab folliikuli erinevaid kihte. Arvatakse, et folliikulis katkete tekkimist põhjustavad kindlad proteaasid, mille toimetel hüdrolyüsatakse folliikuli kestadesse katked (Lubzens *et al.*, 2010). Siiski erinevate proteaaside mõju ja toimemehhanismide endi kohta kalades on vähe teada (Goetz & Garczynski, 1997; Lubzens *et al.*, 2010).

Ovulatsioon, nagu ka küpseminegi, on kontrollitud gonadotropiinide poolt. Erinevalt küpsemisest, mis on genoomsetest protsessidest sõltumatu KIH poolt esilekutsutud protsess, vajab ovulatsioon transkriptsioonilist aktiivsust ja uute mRNA-de sünteesi (Pinter & Thomas, 1999). See teeb ovulatsioonist keerukama protsessi ning täpsemad mehhanismid, kuidas ovulatsiooni indutseerimine kalades toimub, pole täpsemalt teada.

Ootsüüdi väljumine toimub mehaaniliste mõjutuste abil. Ovulatsiooni toimumisel on oluline osa follikulaarepiteeli rakkude kokkutõmbumisel, mida initsieerivad prostaglandiinid (kaladel enamasti prostaglandiin F2 α). (Stacey & Goetz, 1982).

1.3 Ootsüütide küpsemise ja ovulatsiooni esilekutsumine kaladel

1.3.1 Indutseerimine *in vivo* tingimustes

Ootsüüdi küpsemise ja ovulatsiooni esilekutsumise olulisus seisneb kasvatustingimuste eripärasustes. On kaks põhjust (Donaldson & Hunter, 1983), miks kunstlikes tingimustes ei pruugi kaladel paljunemine õnnestuda. Ühelt poolt ei pruugi kohalikud kasvukeskkonna tingimused täpselt sobida meid huvitava kalaliigi suhtes, teisalt kunstlikud tingimused ei ole piisavalt sarnased looduslike tingimustega, mis kutsuvad esile sigimiseks vajalikke etealmistavaid protsesse.

Optimaalsed keskkonnatingimused, mis kutsuvad esile küpsemist ja ovulatsiooni, on palju rangemalt reguleeritud kui munarakkude üldise arenguga seotud protsessidel. Siiski saab välistingimustest teatud määral mööda minna, kasutades hormone. On olemas kaks meetodit (Rottmann *et al.*, 1991), kuidas kaladel esile kutsuda munarakkude küpsemist ja ovulatsiooni: kasutades küpsemist soodustavaid hormone või alla suruda küpsemist blokeerivate ainete mõju.

Küpsemist ja ovuleerumist soodustavate ainetena kasutatakse hüpofüüsi ekstrakte, puhastatud gonadotropiine, gonadotropiine vabastavaid aineid, steroide ja prostaglandiine (Rottmann *et al.*, 1991). Õige aine valik sõltub liigist ning hormoonide kättesaadavusest. Lisaks mõjutavad hormoonide toimet kala tervislik olukord, kala suguküpsuse aste, kala suurus, vee temperatuur ja aastaeg (Rottmann *et al.*, 1991). Vastavalt vajadusele saab kasutada hüpofüüsi ekstrakte ja puhastatud gonadotropiine munasarjade stimuleerimiseks, ning steroidseid hormone ja prostaglandiine otseselt munarakkude mõjutamiseks.

Sugurakkude küpsemist inhibeeriva ainenä on teada hetkel dopamiin, mis pärsib gonadotropiine vabastava hormooni vabastamist (Dufour *et al.*, 2010). Dopamiini tõttu ei ole võimalik hüpotaalamus-hüpofüüs-follikulaarepiteel telje kaudu suunata ootsüüte küpsemisstaadiumini. Kalade sugurakkude tahtlikuks küpsemisprotsessi käivitamiseks on hakatud kasutama dopamiinide mõju allasuruvaid aineid – dopamiini antagoniste.

Dopamiini negatiivse mõju avastamine ootsüütide küpsemisele on kaasa aidanud tehistingimustes kalade reprodutseerimisele. See on võimaldanud suurendada tehistingimustes kasutatavate küpsemist soodustavate hormoonide tõhusust. Katsetes (El-Hawarry *et al.*, 2012) on kasutatud dopamiinide antagonistide koos gonadotropiine vabastavate hormoonidega, mis on andnud paremaid tulemusi, kui hormoonid üksinda.

Hormoonidest kasutatakse enamasti karpkala (Szabó, 2003; Krejszeff *et al.*, 2008) või lõhe (Rottmann *et al.*, 1991) hüpofüüsi ekstrakti. Siiski antud meetodi puhul sõltub ootsüütide küpsemise edukus isendi gonadotropiinide avaldumise potentsiaalst ning tulemusi on raske ennustada (Haniffa *et al.*, 2000). Kasutusel on nii värskest kogutud kui ka pulbrilised ekstraktid.

Täiendavalt kasutatakse erinevaid hormoone. Edukalt on kasutatud gonadotropiinidest inimese koorioni gonadotropiini (Kucharczyk *et al.*, 1997, Kucharczyk *et al.*, 1999; Krejszeff *et al.*, 2008). Siiski on täheldatud, et inimese koorioni gonadotropiini kasutades võib küll aktiveeruda ootsüüdi küpsemisperiood, ent protsess ei pruugi jõuda välja ovuleerumiseni. Probleemi lahendamiseks on kasutatud küpsemist soodustavat hormooni ($17\alpha,20\beta\text{P}$), mille mõjul märgatavalt kasvas ovuleerumise edukus (Yamamoto *et al.*, 2015). Oletatakse, et isenditel võivad esineda steroidsete hormoonide (sealhulgas KIH) sünteesimise blokeerimismehhanismid, mille tõttu ei ole võimalik ilma täiendavate hormoonide kasutamata võimalik viia ootsüüdi küpsemisprotsessi lõpuni.

1.3.2 Indutseerimine *in vitro* tingimustes

Kalade ootsüütide küpsemist ja ovulatsiooni esilekutsumist on võimalik teostada ka organismiväliselt *in vitro* tingimustes. *In vitro* küpsemise ja ovulatsiooni esilekutsumist kasutatakse ootsüütides toimuvate visuaalsete muutuste jälgimiseks ning protsesside toimemehhanismide uurimisel. Erinevalt *in vivo* tingimustest, annab see uurimismeetod võimaluse teha põhjalikumaid uuringuid ootsüütide arengu kohta. Hormoonide mõjul saab folliikulisisesel *in vitro* tingimustes ootsüüdil esile kutsuda tuumaümbrise lagunemisstaadiumi (mis on küpsemisperioodi alguse tähiseks).

Kasutatava hormooni valik sõltub ootsüüdi arengustaadiumist. Ootsüütidel esineb periood, mil küpsemist kutsuvad esile ainult gonadotropiinid, mitte steroidhormoonid (KIH) (Nagahama, 1994). Kui aga mõjutada ootsüüte esmalt gonadotropiinidega, siis muutuvad nad tundlikuks ka KIH mõjutustele, mille alusel on arvatud, et gonadotropiinidel on oluline osa ootsüütide küpsemiskompetentsuse saavutamisel. Gonadotropiinid mõjuvad folliikuli pinnaretseptoritele. Ootsüüdid, millelt on tehislikult eemaldatud ümbritsev folliikuli kest, ei suuda gonadropiini lisamisel alustada küpsemisstaadiumi.

On täheldatud (Suwa & Yamashita, 2007), et *in vitro* tingimustes on ootsüüdid võimelised läbima ovulatsiooni ilma täiendava hormonaalse stimulatsioonita, kui vahetult enne elusast kalast eemaldamist on läbitud tuumaümbrise lagunemise staadium (on läbitud meioosi I profaas). Ovulatsiooni toimumisel on täheldatud ka suurt osa prostaglandiinidel. Nende lisamisel *in vitro* tingimustes on kiirendanud ovulatsiooni toimumist (Stacey & Goetz, 1982)..

2 Praktiline osa

2.1 Materjal ja metoodika

Ahvena ovulatsiooni ja marjalindi kujunemise uurimiseks kasutati looduslikust populatsioonist pärit ahvenate marja inkubeerimist laboritingimustes. Käesoleva töö materjal on kogutud 2014. a maikuu esimeses dekaadis (ahvena loodusliku sigimise perioodil). Pärnu jõest ja Pärnu lahest püüti suguküpsed ahvenad (*Perca fluviatilis* L.) ja transporditi veekastis elusalt hoituna laborisse. Ahvenate püüki ning nende transportimist baasi viisid läbi kohalikud seirepüüki teostavad instituudi töötajad.

Kokku oli katsealuseid ahvenaid 32 – 3 isast ja 29 emast. Katsealustest emastest kaladest püüti 11 esimesel päeval, 10 treisel päeval ja 8 kolmandal päeval. Emastelt ahvenatelt võtsin pintsettide ja prepareerimisnõela abil gonaaditükke (keskmiselt ~10 ootsüüti igas tükis). Need asetasin petri tassil olevasse Ringeri lahusesse (liitris vees 6,5 g NaCl, 0,2 g KCl, 0,2 g CaCl₂ ja 0,2 g NaHCO₃) ovuleerima. Igast emasest isendist võtsin 2 proovi. Nendest esimese proovi asetasin ühele petri tassile ja teise eraldiseisvale tassile. Mõlemad tassid olid märgitud ühise numbriga ning nende inkubeerimine toimus paralleelselt erinevatel temperatuuridel - vastavalt 18-19°C (toatemperatuur, mis on mõõdetud tavalise termomeetriga) ja külmikus 6-7°C juures. Temperatuur sai valitud ahvena loomuliku kudemisaja temperatuuri alusel. Ahvena ootsüütide arengu optimaalseks temperatuurivahemikuks on 6-18°C (Saat & Veersalu, 1996). Selles vahemikus toimub areng kiiremini kõrgematel temperatuuridel, võimaldades jälgida ahvena ovulatsiooniprotsessis lühema ooteaja jooksul, kuid jahedamas hoitud eksemplaridel on võimalik muutusi täpsemalt jälgida. Samuti on madalamal temperatuuril inkubeerides väiksem oht, et protsessid toimuvad liiga kiiresti, mille tõttu võib jääda midagi jäädvustamata. Kummaski temperatuurirežiimis oli üks proovide eksemplar kõigist emastest võetud proovidest (kummaski kokku 29 tassi). Inkubeerimiskatsed isenditest tehti vahetult pärast ahvenate püüdmist ja laborisse toimetamist.

Iga tunni tagant kontrollisin eri temperatuuridel asetsevates ootsüütide tsütoplasmas toimuvaid muutuseid. Läbipaistmatutes ootsüütides jälgisin tuumaümbrise lagunemise staadiumi toimumist, et olla valmis ovulatsiooni jäädvustamiseks. Kuna eesmärgiks oli jäädvustada ahvena ovulatsioon ning sellele järgnev lindi moodustumise protsess, siis vahepealsete etappide märkimist ega jäädvustamist ei toimunud. Kokkuvõtte toimunud muutustest tehti päevade lõikes. Ootsüütide arengustaadiumid fikseerisin visuaalsel vaatlusel stereomikroskiibiga Nikon SMZ 800. Kogu protsessi salvestamiseks kasutasin mikroskoobiga ühendatud fotoseadet Nikon Digital Sight DS-L2.

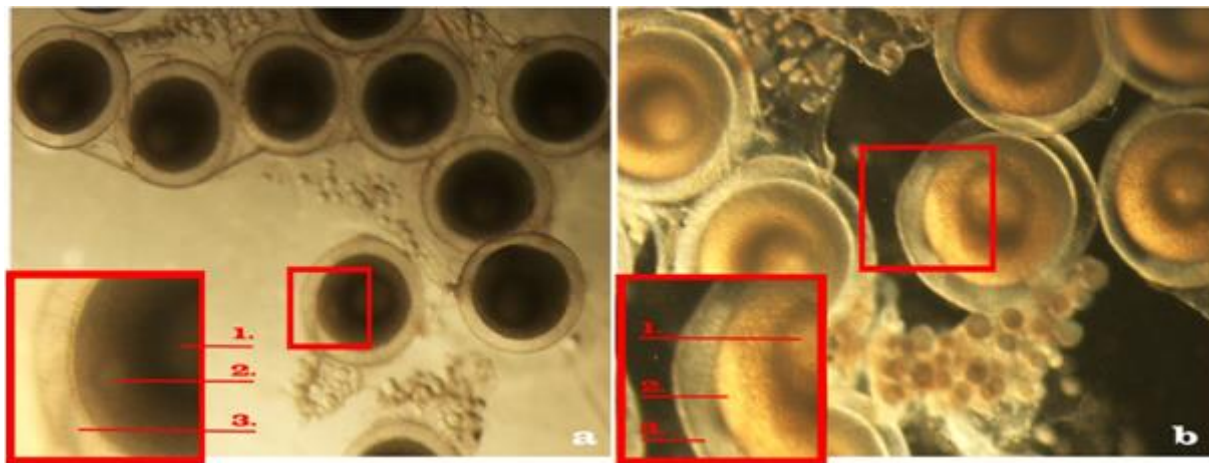
Meioosi profaasis olevad ootsüütidele, mis olid läbipaistmatud, lisasin vaatluse ajal äädikat. Viimane muudab tsütoplasma läbipaistvaks ning antud staadiumis veel intaktse tuuma valgeks. Ovuleerumise stimulatsiooniks hormoone ei kasutanud. Äädikat lisati gonaaditükkidele, mis asetati katsest eraldiseisvale petri tassile, et vältida arengulist peatumist kõigis ühes katseeksemplaris asetsevates ootsüütides.

Viljastamiskatsed viisin läbi, et selgitada kas antud katses ning tingimustes ovuleerunud ning lindi moodustanud munad on viljastamisvõimelised, veendumaks, kas protsess on toimunud õigesti ning tekkinud on funktsionaalne marjalint. *In vitro* ovuleerunud marjaterade viljastamine toimus kuivmeetodil. Puhta petri tassi peale asetatud munarakkudele lisasin peale tilga isase ahvena spermat. Lisasin kraanivett ning lasin 30 sekundi vältel viljastuda. Seejärel eemaldasın spermalahuse ja viljastatud munarakud loputasin kraanivees. Kogu areng toimus temperatuuril 18-19°C puhtas kraanivees.

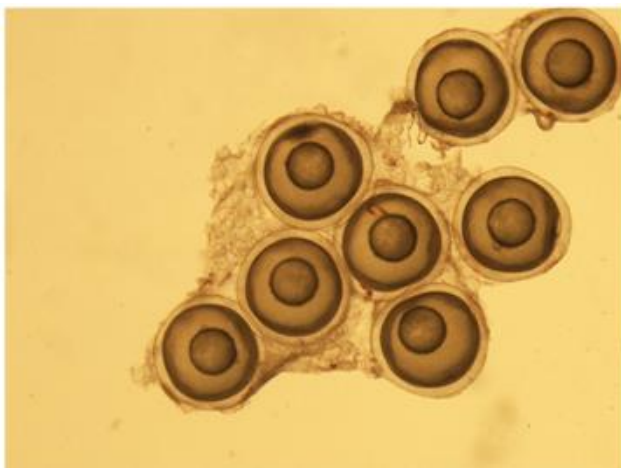
Laboritingimustes moodustunud marjalinti võrdlesin looduslikult moodustunud marjalindi struktuuriga, mis annab teada, kas laboritingimustes moodustunud lint on sarnase struktuuriga või käib protsess teisiti. Looduslikult moodustunud marjalindi kogusin emastelt ahvenatelt, kellel oli juba ouleerumisprotsess toimunud.

2.2 Tulemused

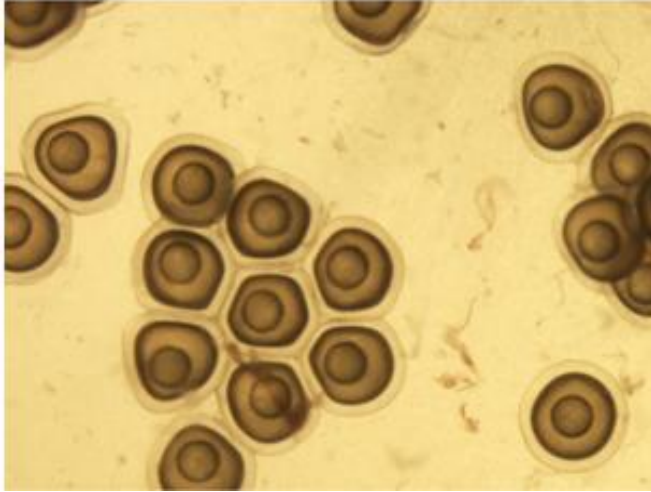
Katsesse võetud kaladest 29st emasest olid 25 isendil läbipaistmatud ja intaktse tuumaga ootsüüdid (joonis 2). Kahe kala ootsüüdid olid poolläbipaistvad (joonis 3) ja kahel kalal olid gonaadis ovuleerunud munad, mis Ringeri lahusesse panduna olid kas üksikud või agregeerunud väiksemateks kogumiteks (joonis 4).



Joonis 2. Intaktse tuumaga ootsüüdid katse lähtestaadiumis. a) Profasis olevad läbipaistmatud ootsüüdid; b) Ringeri lahusele on lisatud äädikat, mis on muutnud tsütoplasma läbipaistvamaks ja tuumad heledaks. 1 – õlitilk, 2 – tuum, 3 – ootsüüdi kest.



Joonis 3. Gonaadi fragment ovuleerumata poolläbipaistvate (tuumaiümbriis lagunenud) ootsüütidega katse lähtestaadiumis



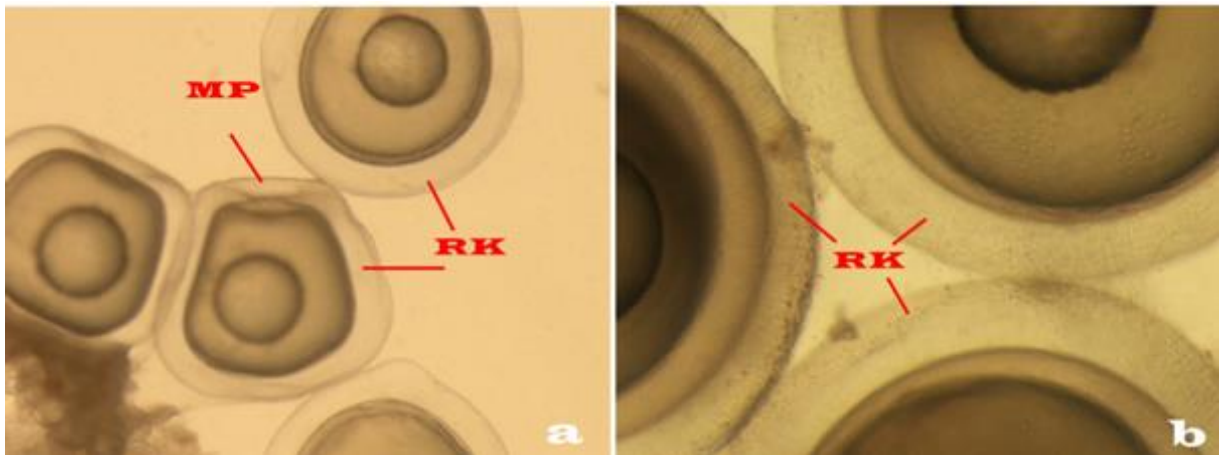
Joonis 4. *In vivo* ovuleerunud munad Ringeri lahuses üksikutena ja agregeerununa väiksematesse kogumitesse

Ovuleerumine toimus antud katses temperatuurist sõltumatult. Pigem sõltus ovuleerumine ootsüütide algstaadiumist, mil nad kalast eemaldati. (vt. tabel 1). Kuna hormoone ootsüütide stimuleerimiseks ei kasutatud, siis arengulisi muutuseid võis väha vaid neis ootsüütides, mis olid saanud loomuliku hormoonse mõjutuse vahetult enne kalast eemaldamist (need munad, mis olid poolläbipaistvad ehk milles on juba toimunud tuumaümbrise lagunemine).

Isend	17		18		19		20		21		22		23		24	
t ^o	6°C	18°C	6°C	18°C	6°C	18°C	6°C	18°C	6°C	18°C	6°C	18°C	6°C	18°C	6°C	18°C
Proov	17a	17b	18a	18b	19a	19b	20a	20b	21a	21b	22a	22b	23a	23b	24a	24b
Ootsüütide arenguline etapp prepareerimishetkel	Läbipaistmatud		Läbipaistmatud		Läbipaistmatud		Läbipaistmatud		Läbipaistmatud		Läbipaistmatud		Läbipaistmatud		Läbipaistmatud	
Muutused ootsüütide tuumas/ tsütoplasmas																
1. päeval	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
2. päeval	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	**	**	**	**	**	**
3. päeval	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ovulatsiooni toimumine katses	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Isend	25		26		27		28		29	
t ^o	6°C	18°C	6°C	18°C	6°C	18°C	6°C	18°C	6°C	18°C
Proov	25a	25b	26a	26b	27a	27b	28a	28b	29a	29b
Ootsüütide arenguline etapp prepareerimishetkel	Läbipaistmatud		Ovuleerunud		Pool-läbipaistvad		Läbipaistmatud		Pool-läbipaistvad	
Muutused ootsüütide tuumas/ tsütoplasmas										
1. päeval	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
2. päeval	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**
3. päeval	-	-	x	x	+	+	-	-	+	+
Ovulatsiooni toimumine katses	-	-	x	x	+	+	-	-	+	+

Ootsüüte ümbritseb paks kleepuv radiaalkest, mis on oluline marjalindi moodustumises. Tänu radiaalkesta kleepuvusele ühinevad ahvena ovuleerunud munarakud, moodustades toruja struktuuri. Animaalse pooluse kohal on radiaalkest palju õhem, moodustades (nagu teistel pärisluustel kaladel) mikropüülikanali. Mikropüüli kaudu saab munaraku tsütoplasmani liikuda spermatoosid (joonis 5).

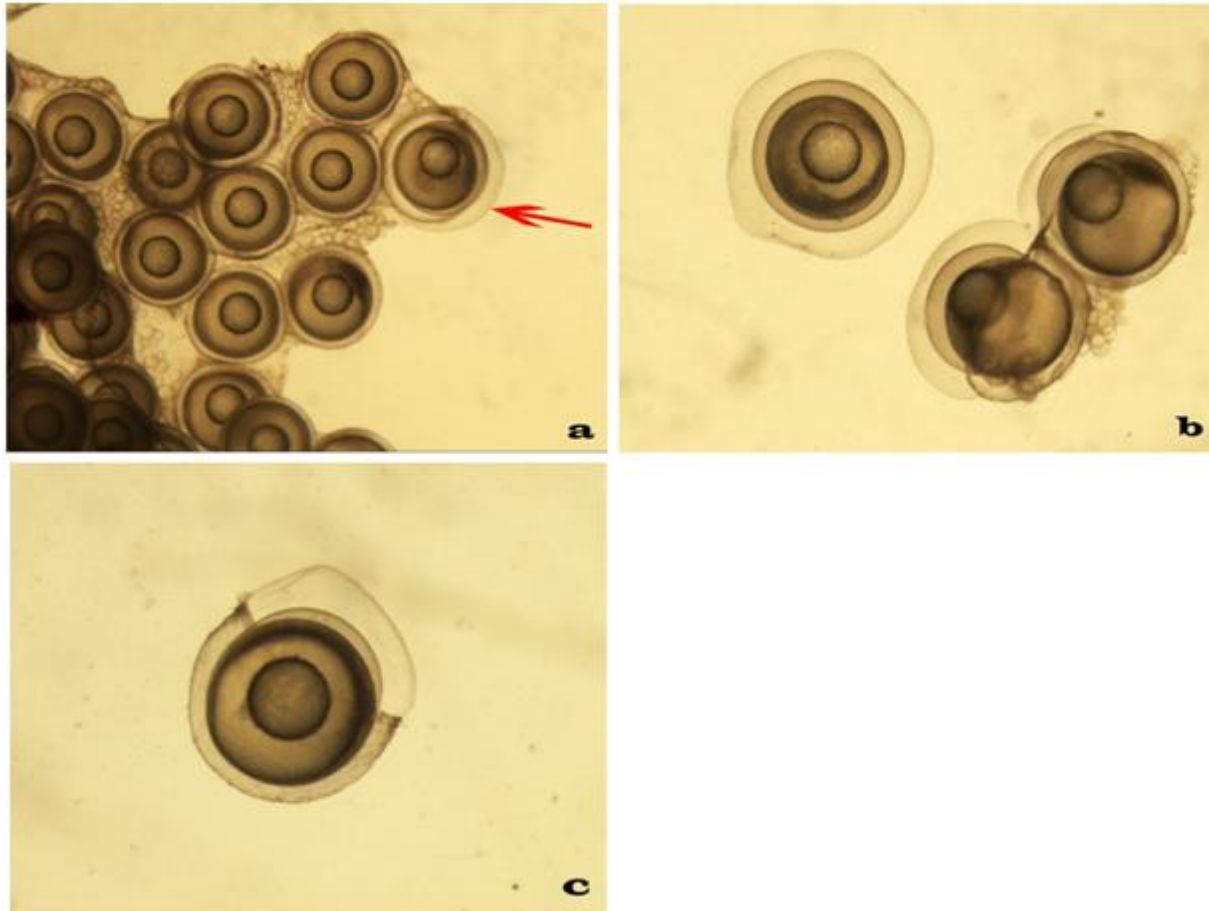


Joonis 5a ja 5b. Ootsüüte katab paks kleepuv radiaalkest (RK), mis on animaalses pooluses õhem, kus asub ava e mikropüül (MP).

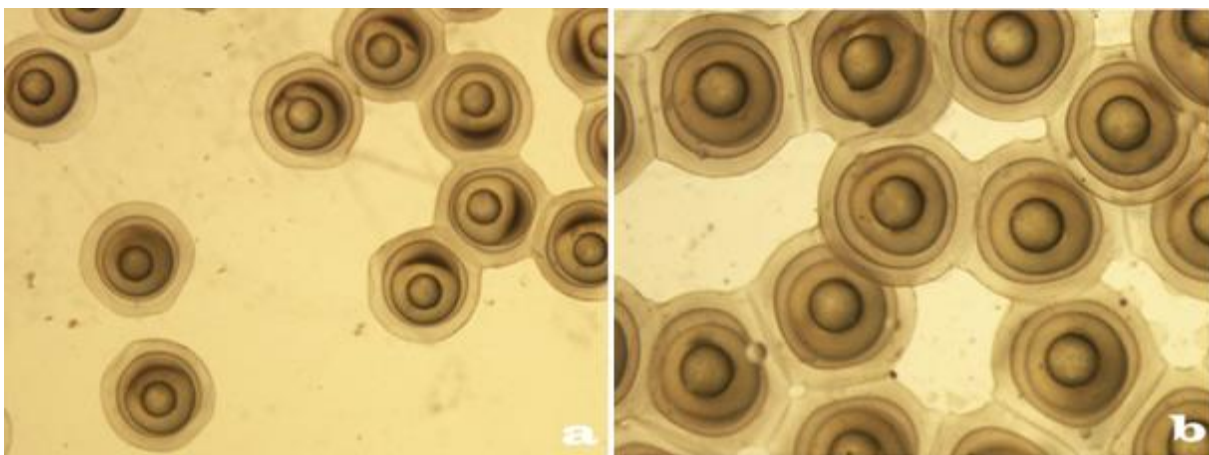
Läbipastmatud ootsüüdid ei ovuleerunud *in vitro* kolme ööpäeva jooksul. Samuti ei toimunud visuaalseid muutuseid ootsüüdi tuumas ega tsütoplasmas. Poolläbipaistvad ootsüüdid (milles oli *in vivo* toimunud tuuma lahustumine, st olid meioosi profaasi lõpus), alustasid ovuleerumist mõni tund pärast nende viimist *in vitro* tingimustesse.

Ahvena ootsüüdid ovuleerusid individuaalselt läbi väikese avause follikulaarepiteelis (joonis 6). Pärast *in vitro* ovuleerumist kleepusid kontakti sattunud munarakud omavahel ja moodustasid struktuuri (joonis 7a), mis oli täiesti sarnane *in vivo* oluleerunud munadest tekkinud marjalindi struktuurile (joonis 7b).

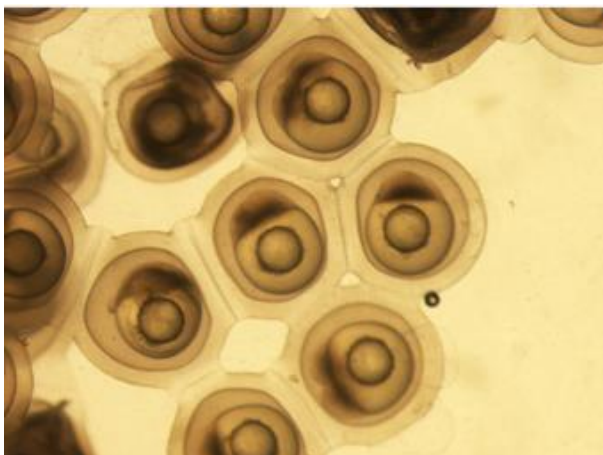
Katses ovuleerunud munarakud olid viljastamisvõimelised. Kahel kalal ovuleerunud ootsüütidega tehti viljastamiskatsed. Ovuleerunud ootsüüdid osutusid viljastumisvõimelisteks ning sügoodid arenesid lõigustumise kahe blastomeeri staadiumini (joonis 8).



Joonis 6. Ovulatsioon. a) Noolega tähistatud ovuleeruv ootsüüt; b) Alumised kaks ovuleeruvat ootsüüti ja ülemine üksik juba ovuleerunud ootsüüt. c) Ovulatsioon toimub ootsüütidel ühekaupa; ovulatsiooni toimumine läbi folliikuli kesta ava.



Joonis 7. Ovuleerunud munarakkude kokkukleepumine ja marjalindi moodustumine; a) *in vitro* ovuleerunud munarakkude marjalint; b) *in vivo* ovuleerunud munarakkude marjalint



Joonis 8. Katses ovuleerunud munarakud olid viljastumisvõimelised. Sügoot on kahe blastomeeri staadiumis.

2.3 Arutelu

Käesolevas töös uurisin ahvena ootsüütide ovulatsiooni ning marjalindi moodustumist. Košelevi (1984) järgi toimub ahvena kõikide ootsüütide ovulatsioon korraga. Protsessi eelduseks olevat ootsüütide sünkroonne areng nii kasvu kui ka küpsemisstaadiumis. Küpsete ootsüütide valmimisel lõhestub follikulaarepiteelkest kesktasandilt ning kogu kest ühtse katusena (Lisa 1). Vastavalt Košelevile ovuleeruvad ootsüüdid ühtse lindina, mis kujul väljutatakse nad ka kehaõõnest. Antud arvamuse, kuidas ahvena munarakud ovuleeruvad korraga, ei vastanud antud töös läbi viidud katsete tulemustele. Katsetes selgus, et ahvena munarakud ovuleeruvad folliikuli kestast ühekaupa.

Ühekaupa ovuleerunud munad kleepuvad füsioloogilises lahuses paksu kleepuva radiaalkesta tõttu kokku. Moodustub ahvenale omane võrkjas struktuur, marjalint, mille kus munad paiknevad ühekihiliselt. *In vitro* moodustunud linti võrreldi *in vivo* ovuleerunud ning kokkukleepunud munarakkudest lindiga, mis annab põhjust arvata, et *in vivo* ja *in vitro* ovulatsiooni protsessid toimuvad sarnaselt.

Varem (Nguenga *et al.*, 2004) on ka näidatud, et esimese 4 tunni jooksul alates ootsüütide inkubeerimisest *in vitro* keskkonnas ei esine inkubeerimistemperatuuril olulist mõju munaraku ja embrüo edasisele arengule. Meie katsete põhjal täiendavaid järeldusi ei saa teha, kuna ovuleerumise toimumine sõltus käesolevas katses ainult ootsüütide arenguetapist, mil nad kalast eemaldati ning minu tulemuste põhjal ei saa väita, milline mõju on temperatuuril.

Siiski katsete tulemuste põhjal saab kinnitada varemmainitut (Suwa & Yamashita, 2007), et munarakud on võimelised ovuleeruma ka stimuleerivaid hormoone kasutamata. Eranditult ovuleerusid ainult ootsüüdid, mis olid poolläbipaistvad. Neis oli lõppemas või on lõppenud meioosi I profaas ning tuumaümbris on lagunenu. Ovuleerumiseks vajalikud hormonaalsed mõjutused on toimunud juba enne kalast eemaldamist.

Katses ovuleerunud munarakud olid viljastumisvõimelised. Antud katses *in vitro* moodustunud marjalint ei seganud loomulikku viljastumisprotsessi. Siit võib järeldada, et kuna ahvena marjalint oli nii struktuurilt sarnane *in vivo* lindiga kui ka füsioloogiliselt toimiv, siis pole põhjust arvata, et ovulatsioon ja lindi moodustumine toimub teisiti, kui antud katse tulemustes kirjeldatud. Ootsüütide küpsemine (meioos) ja ovulatsioon on loomariigis morfoloogiliselt kui ka ajaliselt küllaltki konservatiivsed, mis on ka mõistetav nende protsesside universaalsuse tõttu.

Kokkuvõte

Ootsüütide küpsemiseks nimetatakse perioodi, mil ootsüüdi tuumas jätkatakse meioosi I profaasi toimumist ning lõpeb vahetult enne ovulatsiooni, mil tuum on jõudnud arenguga II metafaasi staadiumisse. Kogu protsessi vältel toimuvad ootsüüdis mitmed muutused. Ootsüüdi tuumaümbris laguneb ning tuum liigub animaalse pooluse poole. Kortikaalgraanulid transporditakse ootsüüdi pinna lähedale ning paigutuvad sinna ühekihiliselt. Kasvab ionide kontsentratsiooni ning toimub kasvuperioodil ootsüüti ladestunud vitellogeniini lagundamine, mille tõttu kasvab ootsüüdi osmootne rõhk ning vesi siseneb rakku. Selle tulemusel ootsüüt paisub ning muutub läbipaistvamaks. Kogu küpsemisprotsessi käigus muutub ootsüüt viljastamisvõimeliseks ning sel hetkel nimetatakse teda juba munaks.

Ootsüütide küpsemine on reguleeritud hormonaalselt hüpotaalamus-hüpofüüs-follikulaartelje kaudu. Optimaalsete väliste keskkonnategurite mõjul hakatakse hüpotaalamuses tootma gonadotropiine vabastavat hormooni. Antud hormoon mõjutab hüpofüüsis toimuvaid protsesse ning hakatakse tootma gonadotropiini, mis kantakse vere vahendusel munasarja, kus nad reageerivad teeka kihi rakkude pinnareseptoritega ning selle mõjutusel käivitub ootsüütide küpsemisperiood. Tähtsamateks gonadotropiinideks ootsüütide arengus on folliikuleid stimuleeriv hormoon ja luteniseeriv hormoon, millest viimane on olulisem just küpsemisprotsessi käivitamises. Gonadotropiini mõjul saavutavad ootsüüdid võime reageerida küpsemist soodustava hormooni suhtes – nad on saanud küpsesmiskompetensuse. Kalades enim levinud on küpsemist soodustav hormoon on $17\alpha,20\beta$ -dihüdroksü-progesteron

Ovulatsiooni käigus toimub küpse munaraku väljumine follikulaarepiteelist ning. Ovulatsiooni eelduseks on vajalikud ettevalmistavad etapid nagu folliikuli-ootsüüdi vaheliste sidemete katkemine ja folliikuli kesta katkimine. Ootsüüdi väljumise puhul on ilmselt tegemist mehhaanilise protsessiga, kus folliikuli epiteeli rakud tõmbuvad prostaglandiinide mõjutusel kokku. Ovulatsiooni, nagu ka küpsemist, kontrollivad samuti gonadotropiinsed hormoonid, kuid protsess on ise palju keerulisem. Vajalik on transkriptsiooniline aktiivsus ja uute mRNA-de süntees, kuid täpsemad mehhanismid on seni teadmata.

Ootsüütide küpsemist ja ovulatsiooni saab tehislikult esile kutsuda hormoonide mõjul. Kasutatakse nii kalades kontrollitud ajal järglaspõlvkondade saamiseks kalakasvatustes kui ka laboritingimustes ootsüüdis toimuvate protsesside jälgimiseks. Vastavalt vajadusele kasutatakse kalade puhul hüpofüüsi ekstrakte ja puhastatud gonadotropiine isendite munasarjade stimuleerimiseks või gonadotropiine, steroide ja prostaglandiine otseselt munarakkude mõjutamiseks. Samuti on laboritingimustes võimalik teostada ootsüütide küpsemis- ja ovulatsiooni katseid ilma täiendavaid hormoone kasutamata, kui ootsüüdid on vahetult enne kalast eemaldamist läbinud tuumaümbrise lagunemise etapi.

Katsete tulemused näitavad, et ahvena munarakud ovuleeruvad ühekaupa. Pärast ovuleerumist kleepuvad munarakud paksu radiaalkesta kaudu kokku, moodustades marjalindi. *In vitro* tingimustes jõuavad ovuleerumisstaadiumisse ilma täiendavate hormoonide mõjutusteta need ootsüüdid, mis vahetult enne kalast eemaldamist on läbinud tuumaümbrise lagunemise staadiumi.

Summary

Oocyte maturation and ovulation in fishes.

Oocyte ovulation and formation of egg ribbon in Eurasian perch (*Perca fluviatilis* (L.))

Oocyte maturation is a process where oocyte nucleus resumes meiosis at I metaphase and ends prior to ovulation when nucleus has reached II metaphase. During the maturation period oocyte goes through several changes in cytoplasm and nucleus. Nucleus moves to more peripheral position and its membrane breaks down. Cortical granules are translocated near cell surface and are positioned in one layer. The increasing concentration of ions and the increase in free amino acids generated from the hydrolysis of vitellogenin proteins provide the osmotic mechanism for water influx into the oocyte. Due to the water uptake the oocyte diameter increases and becomes less opaque. In result, mature fertilizable egg is formed.

Oocyte maturation is regulated hormonally by hypothalamic-pituitary-follicle axis. Optimal environmental conditions stimulate hypothalamus to release gonadotropin-releasing hormone, which induces synthesis of gonadotropins in pituitary. Gonadotropins are transported to follicles via blood stream where they interact with gonadotropin-receptors on thecal cells layer. Interaction with receptors initiates sequence of events that induce starting of a maturation stage. Most important gonadotropins are luteinizing hormone and maturation-inducing hormone. In inducing maturation, maturation-inducing hormone is more relevant. In fishes most known gonadotropin is $17\alpha,20\beta$ -dihydroxy-progesterone.

During ovulation, mature egg is released from the follicular cell. Ovulation requires preparational changes in the follicle: separation of mature oocyte (egg) from follicle wall and the rupture of follicle wall. Releasing of an egg is probably accomplished through active contraction of the follicular wall cells through the oocyte rupture site which is induced by prostaglandins. Oocyte ovulation, like maturation, is controlled by gonadotropins, though the process itself is more complex, requiring transcriptional activity and synthesis of new mRNAs, therefore exact mechanisms are not well known.

Oocyte maturation and ovulation can be induced by hormones. Inducing maturation and ovulation is widely used in fish farms to produce newborn fishes throughout the year or for research purposes of mechanisms of oocyte maturation and ovulation. Pituitary extracts and gonadotropins are used for stimulating live specimen, and gonadotropins, steroids and prostaglandins for stimulating oocytes in laboratory conditions. Therefore, *in vitro* conditions ovulation can be observed without adding any extra hormones, if oocytes are gone through the process of nucleus membrane breakdown.

Results of our *in vitro* study show that eggs of a perch ovulate individually as in other fishes. After ovulation eggs adhere because of thick and sticky radial layer and form a ribbon-like egg mass. Ovulation does occur spontaneously *in vitro* if the oocytes have already undergone germinal vesicle breakdown prior to their removal from the fish.

Tänu sõnad

Täna oma juhendajat Toomas Saati juhendamise eest.

Samuti tänan Eesti Mereinstituudi Pärnu osakonna töötajaid, kes aitasid katsete toimumisele kaasa elusate ahvenate püüdmisega.

Täna ka Taavi Virrot ja Ann Krauti, kes aitasid omapoolsete kommentaaridega tööd täiustada.

Kasutatud kirjandus

- Ankley, G.T. & Rodney, J.D. (2004).** Small Fish Models for Identifying and Assessing the Effects of Endocrine-disrupting Chemicals. Institute for Laboratory Animal Research Journal: 45, 469-483.
- Børge, A.K. & Finn, R.N. (2008).** Major osmolyte changes during oocyte hydration of a clupeocephalan marine benthophil: Atlantic herring (*Clupea harengus*). Marine Biology: 154, 683–692.
- Coward, K., Bromage, N.R., Hibbitt, O. & Parrington, J. (2002).** Gamete physiology, fertilization and egg activation in teleost fish. Reviews in Fish Biology and Fisheries: 12, 33–58.
- Dufour, S., Sebert, M.E., Weltzien, F.A., Rousseau, K. & Pasqualini, C. (2010).** Neuroendocrine control by dopamine of teleost reproduction. Journal of Fish Biology: 76, 129–160.
- Donaldson, E.M., & Hunter, G.A. (1983).** Induced final maturation, ovulation and spermiation in cultured fish. Fish physiology vol. IX, part B: Reproduction Behavior and Fertility Control (Eds. Hoar, W.S., Randall, D.J. & Donaldson, E.M.). Elsevier, lk 351-390.
- El-Hawarry, W.N., Nemaatallah, B.R. & Shinaway A.M. (2012).** Induced Spawning of Silver Carp, Hypophthalmichthys molitrix Using Hormones/Hormonal Analogue with Dopamine Antagonists. Online Journal of Animal and Feed Research: 2, 58-63.
- Fontaine, P., Kestemont, P., Teletchea, F. & Wang, N. (2008).** The European market for perch (*Perca fluviatilis*). Percid Fish Culture From Research to Production. Presses universitaires de Namur, Namur, Belgium. pp. 10-15.
- Ge, W. (2005).** Gonadotropins and their paracrine signaling network in the zebrafish ovary. Fish Physiology and Biochemistry: 31, 209–214.
- Goetz, F.W. & Garczunski, M. (1997).** The ovarian regulation in teleost fish. Fish physiology and Biochemistry: 17, 33–38.

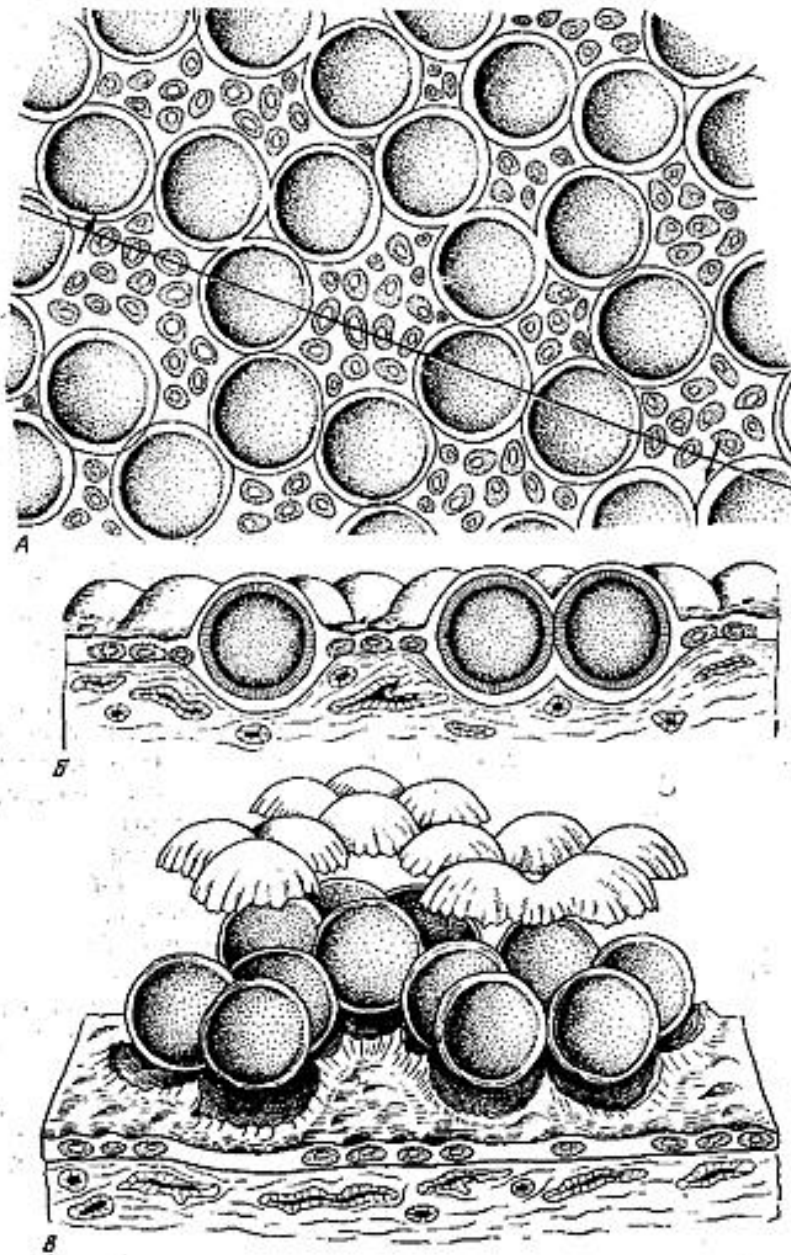
- Haniffa, M.A., Merlin, T., Shaik Mohamed, J. (2000).** Induced spawning of the striped murrel, *Channa striatus*, using pituitary extracts, human chorionic gonadotropin, luteinizing hormone releasing hormone analogue, and ovaprim®. *Acta Ichthyologica et Piscatoria*: 30, 53-60.
- Kim, S., Spike, C. & Greenstein, D. (2013).** Control of Oocyte Growth and Meiotic Maturation in *Caenorhabditis elegans*. *Advances in Experimental Medicine and Biology*: 757, 1-42.
- Кошелев, Б.В. (1984).** Особенности гаметогенеза окуневых рыб (сем. Percidae). Экология размножения рыб. Академия Наук СССР, Москва. pp. 108.
- Krejszeff, S., Kucharczyk, D., Kupren, K., Targońska, K., Mamcarz, A., Kujawa, R., Kaczowski, Z., & Ratajski, S. (2008).** Reproduction of chub, *Leuciscus cephalus* L. under controlled conditions. *Aquaculture Research*: 39, 907-912.
- Kucharczyk, D., Kujaiva, R., Luczynski, M., Glogowski, I., Babiak, I. & Wyszomirska, E. (1997).** Induced spawning in bream, *Abramis brama* (L.), using carp and bream pituitary extract and hCG. *Aquaculture Research*: 28, 139-144.
- Kucharczyk, D., Kujawa, R., Mamcarz, A., Wyszomirska, E. & Ulikowski, D. (1999).** Artificial spawning of ide (*Leuciscus idus*) under controlled conditions. *Electronic Journal of Polish Agricultural Universities*: 2, #05.
- Lubzens, E., Young, G., Bobe, J. & Cerdà, J. (2010).** Oogenesis in teleosts: How fish eggs are formed. *General and Comparative Endocrinology*: 165, 367–389.
- Maestro, M.A., Méndez, E., Planas, J.V. & Gutiérrez, J. (1999).** Dynamics of insulin and insulin-like growth factor-I (IGF-I) ovarian receptors during maturation in the brown trout (*Salmo trutta*). *Fish Physiology and Biochemistry*: 20, 341–349.
- Mélard, C., Kestemont, P., & Grignard, J.C. (1996).** Intensive culture of juvenile and adult Eurasian perch (*P. fluviatilis*): effect of major biotic and abiotic factors on growth. *Journal of Applied Ichthyology*: 12, 175 – 180.
- Migaud, H., Fontaine, P., Kestemont, P., Wang, N. & Brun-Bellut, J. (2004a).** Influence of photoperiod on the onset of gonadogenesis in Eurasian perch *Perca fluviatilis*. *Aquaculture*: 241, 561 – 574.

- Migaud, H., Gardeur, J. N., Kestemont, P. & Fontaine, P. (2004b).** Off-season spawning of Eurasian perch *Perca fluviatilis*. *Aquaculture International*: 12, 87–102.
- Nagahama, Y. (1987).** $17\alpha,20\beta$ -Dihydroxy-4-pregnen-3-one: A Teleost Maturation-Inducing Hormone. *Development Growth and Differentiation*: 29, 1-12.
- Nagahama, Y. (1994).** Endocrine regulation of gametogenesis in fish. *The International Journal of Developmental Biology*: 38, 217-229.
- Nguenga, D., Teugels, G.G., Legendre, M. & Ollevier, F. (2004).** Effects of storage and incubation temperature on the viability of eggs, embryos and larvae in two strains of an African catfish, *Heterobranchus longifilis* (Siluriformes, Clariidae). *Aquaculture Research*: 35, 1358-1369.
- Patiño, R., Yoshizaki, G., Thomas, P. & Gagawa, H. (2001).** Gonadotropic control of ovarian follicle maturation: the two-stage concept and its mechanisms. *Comparative Biochemistry and Physiology*: B129, 427-439.
- Patiño, R. & Sullivan, C.V. (2002).** Ovarian follicle growth, maturation, and ovulation in teleost fish. *Fish Physiology and Biochemistry*: 26, 57-70.
- Pinter, J. & Thomas, P. (1999).** Induction of ovulation of mature oocytes by the maturation-inducing steroid $17,20\beta,21$ -trihydroxy-4-pregnen-3-one in the spotted seatrout. *General and Comparative Endocrinology*: 115, 200–209.
- Rónyai, A. & Lengyel, S.A. (2010).** Effects of hormonal treatments on induced tank spawning of Eurasian perch (*Perca fluviatilis* L.). *Aquaculture Research*: 41, e345-e347.
- Rosenfeld, H., Meiri, I. & Elizur, A. (2007).** Gonadotropic regulation of oocyte development. *The Fish oocyte: From Basic Studies to Biotechnological Applications* (Eds. Babin, P.J., Cerdà, J., Lubzens, E.), chapter 7. Springer, Dordrecht, The Netherlands. pp. 175-202.
- Rottmann, R.W., Shireman, J.V. & Chapman, F.A. (1991).** Hormonal Control of Reproduction in Fish for Induced Spawning. Southern Regional Aquaculture Center: 424, 1-4.

- Saat, T. & Veersalu, A. (1996).** The rate of early development in *Perca fluviatilis* L. and ruffe *Gymnocephalus cernuus* (L.) at different temperatures. *Annales Zoologici Fennici*: 33, 693-698.
- Skoblina, M. N. (2009).** *In vitro* Stimulation of Oocyte Ovulation in Teleosts by Gonadotropic and Steroid Hormones. *Russian Journal of Developmental Biology*: 40, 191–197.
- Skoblina, N. (2010).** Hydration of Oocytes in Teleost Fishes. *Russian Journal of Developmental Biology*: 41, 1–12.
- Sullivan, C.V., Hiramatsu, N., Kennedy, A.M., Clark, R.W., Weber, G.M., Matsubara, T. & Hara, A. (2003).** Induced maturation and spawning: opportunities and applications for research on oogenesis. *Fish Physiology and Biochemistry*: 28, 481–486.
- Stacey, N.E. & Goetz, F.W. (1982).** Role of Prostaglandins in Fish Reproduction. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*: 39, 92-98.
- Suwa, K. & Yamashita, M. (2007).** Regulatory mechanisms of oocyte maturation and ovulation. *The fish oocyte* (Eds. Babin, P.J., Cerdà, J., Lubzens, E.). Springer, Springer, Dordrecht, The Netherlands. pp. 324-342.
- Szabó, T. (2003).** Ovulation induction in northern pike *Esox lucius* L. using different GnRH analogues, Ovaprim, Dagin and carp pituitary. *Aquaculture research*: 34, 479-486.
- Żarski, D., Krejszeff, S., Horváth, Á., Bokor, Z., Palińska, K., Szentes, K., Łuczyńska, J., Targońska, K., Kupren, K., Urbányi, B., & Kucharczyk, D. (2012a).** Dynamics of composition and morphology in oocytes of Eurasian perch, *Perca fluviatilis* L., during induced spawning. *Aquaculture*: 364–365, 103–110.
- Żarski, D., Kucharczyk D., Targońska K., Paliska K., Kupren K., Fontaine P. & Kestemont P. (2012b).** A new classification of pre-ovulatory oocyte maturation stages in pikeperch, *Sander lucioperca* (L.), and its application during artificial reproduction. *Aquaculture Research*: 43, 713–721.

- Targónska, K., Szczerbowski, A., Żarski, D., Łuczyński, M.J., Szkudlarek, M., Gomulka, P. & Kucharczyk, D. (2014).** Comparison of different spawning agents in artificial out-of-season spawning of Eurasian perch, *Perca fluviatilis* L. Aquaculture Research: 45, 765–767.
- Wessel, G.M., Conner, S.D. & Berg, L. (2002).** Cortical granule translocation is microfilament mediated and linked to meiotic maturation in the sea urchin oocyte. Development: 129, 4315-4325.
- Yamamoto, Y., Yatabe, T., Higuchi, K., Takeuchi, Y. & Goro, Y. (2015).** Improvement of ovulation induction by additive injection of 17,20 β -Dihydroxy-4-pregnen-3-one after human chorionic gonadotropin administration in a pelagic egg spawning marine teleost, nibe croaker *Nibea mitsukurii* (Jordan & Snyder). Aquaculture Research: 46, 1323-1331.

Lisa 1.



Lisa 1. Ahvenale omase marjalindi moodustumise tõttu on arvatud, et ovulatsioon toimub omapärasel viisil. A) ahvena ootsüüdid follikulaarkestas pealtvaates; B) läbilõige ahvena ootsüütidest; B) ootsüüte ümbritsev follikulaarepiteel lõhestub lamelli keskjoone tasemel ja eemaldub nagu „katus“ ootsüüdist. (Кошелев, 1984 järgi).

Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja lõputöö üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

Mina, Kristo Ets,

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) enda loodud teose „Ootsüüdi küpsemine ja ovulatsioon kaladel. Ahvena *Perca fluviatilis* (L.) ovulatsioon ning marjalindi modustumine”, mille juhendaja on Toomas Saat.
 - 1.1.reprodutseerimiseks säilitamise ja üldsusele kättesaadavaks tegemise eesmärgil, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace-is lisamise eesmärgil kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni;
 - 1.2.üldsusele kättesaadavaks tegemiseks Tartu Ülikooli veebikeskkonna kaudu, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace'i kaudu kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni.
2. olen teadlik, et punktis 1 nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.
3. kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei rikuta teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse seadusest tulenevaid õigusi.

Tartus, 21.05.2015